

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-338076

(43)Date of publication of application : 08.12.2000

(51)Int.Cl. G01N 27/327
G01N 27/28

(21)Application number : 11-145549

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 25.05.1999

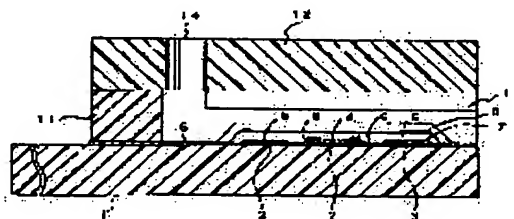
(72)Inventor : MIYAMOTO YOSHIKO
YOSHIOKA TOSHIHIKO
NANKAI SHIRO

(54) BIOSENSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To carry out simple and highly accurate determination by adding an erythrocyte adsorbent to a reaction layer along with enzyme and an electron acceptor, and providing a layer containing the erythrocyte adsorbent at a position not coming into contact with the reaction layer apart from a reactant.

SOLUTION: Leads 2, 3 are formed on an electric insulating substrate 1 comprising polyethylene terephthalate by printing silver paste on the substrate 1 by a screen printing method. An electrode containing an acting electrode 4 comprising conductive carbon paste containing a resin binder and an opposed electrode, and an electric insulating layer 6 comprising electric insulating paste, are further formed on the substrate 1. The insulating layer 6 is pref. formed so as not only to make the area of the exposed parts of the acting electrode 4 and the opposed electrode 6 constant from an aspect making the capacity of a biosensor constant and fitted to disposability but also to cover the leads 2, 3 partially. A hydrophilic polymeric layer and a reaction layer 8 containing enzyme, an electron acceptor and an erythrocyte adsorbent are formed on the electric insulating substrate 1 on which the electrode is thus formed.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-338076
(P2000-338076A)

(43)公開日 平成12年12月8日(2000.12.8)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト*(参考)
G 0 1 N 27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 3 R
27/28	3 3 1	27/28	3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平11-145549	(71)出願人	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
(22)出願日	平成11年5月25日(1999.5.25)	(72)発明者	宮本 佳子 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(72)発明者	吉岡 俊彦 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(72)発明者	南海 史朗 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器 産業株式会社内
		(74)代理人	100072431 弁理士 石井 和郎

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 血液中に存在する赤血球による影響を抑制し、被検物質を高精度に定量できるバイオセンサを提供する。

【解決手段】 電気絶縁性基板上に作用極と対極からなる電極、少なくとも酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含む反応層を設ける。または、赤血球吸着剤からなる層を、酵素および電子受容体を含む反応層と接触しない位置に設ける。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 電気絶縁性基板、前記基板上に形成された作用極および対極を含む電極、ならびに前記電極上に配置された少なくとも酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含有する反応層を具備するバイオセンサ。

【請求項2】 電気絶縁性基板、前記基板上に形成された作用極および対極を含む電極、前記電極上に配置された少なくとも酵素および電子受容体を含有する反応層、ならびに前記反応層に接触しない赤血球吸着剤を含有する層を具備するバイオセンサ。

【請求項3】 赤血球吸着剤がデキストランである請求項1または2記載のバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、血液試料中の特定成分について、迅速かつ高精度な定量を実施するためのバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】試料液の希釈や攪拌などを行うことなく、試料中の特定成分を簡易に定量しうる方式を利用した従来のバイオセンサとしては、例えば特開平3-202764号公報に開示されたものがあげられる。このバイオセンサは、電気絶縁性基板の上にスクリーン印刷などの方法で作用極および対極からなる電極を形成し、さらに電気絶縁層を形成した後に、上記電極上に親水性高分子、酸化還元酵素および電子受容体からなる酵素反応層を形成して得られるものである。そして、試料中に被検物質として基質を含む試料液を酵素反応層上へ滴下すると、酵素反応層が溶解し、ついて基質と酵素の反応により基質が酸化し、これにともなって電子受容体が還元される。この酵素反応が終了した後、還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このときに得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度が求められる。

【0003】ところが、上記のような従来のバイオセンサには、同じ濃度の基質を含むが基質以外の成分の濃度が異なる血液試料について、その基質濃度を測定する場合、センサの応答特性に差が生じるという問題がある。なかでも、赤血球の量がセンサの応答特性に影響することがわかっている。この赤血球の存在に起因する応答特性の変動を解消する手段として、反応層上に濾過層を設け、血液試料中の被検物質以外の成分をトラップする方法が考えられているが、濾過に時間を用意するため測定に長時間を要するという問題がある。また、血液試料の成分の相違による応答特性の差を緩和する方法として、特定の希釈液を用いて血液試料を希釈する方法も有効であるが、工程が煩雑になり、基質濃度の測定に手間がかかるという問題がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、血液試料中の被検物質以外の成分の影響を受けず、

簡易で高精度の定量が可能なバイオセンサを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、電気絶縁性基板、前記基板上に形成された作用極および対極を含む電極、ならびに前記電極上に配置された少なくとも酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含有する反応層を具備するバイオセンサに関する。さらに、本発明は、電気絶縁性基板、前記基板上に形成された作用極および対極を含む電極、前記電極上に配置された少なくとも酵素および電子受容体を含有する反応層、ならびに前記反応層に接触しない赤血球吸着剤を含有する層を具備するバイオセンサにも関する。これらの場合、赤血球吸着剤がデキストランであるのが好ましい。

【0006】

【発明の実施の形態】前述のように、血液試料中の基質濃度を測定する場合、赤血球の存在がバイオセンサの応答特性に悪影響を与える。この原因の一つとして、赤血球が電極近傍に接近し、電極表面を覆うことが考えられる。そのため、電極面積が減少し、赤血球の存在量の違いによって応答値が変化するのである。そこで、本発明者らは、バイオセンサ中に赤血球吸着剤を含めて血液試料中の赤血球を捕捉すれば、赤血球の電極表面への吸着を抑制し、センサの応答特性の変動を抑制することができる点に着目し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明のバイオセンサは、赤血球吸着剤を酵素および電子受容体とともに反応層に含ませる点、または反応層とは別に、反応層に接触しない位置に赤血球吸着剤を含有する層を設ける点に最大の特徴を有する。

【0007】まず、本発明のバイオセンサは血液試料中の被検物質である基質の濃度を測定するものである。この被検物質としては、例えばグルコース、コレステロール、乳酸、アスコルビン酸、ビリルビン、尿酸などがあげられる。つぎに、本発明のバイオセンサを構成する要素は、概ね従来公知のものでよいが、以下に簡単に説明する。

【0008】本発明において用いる電気絶縁性基板は、例えばポリエチレンテレフタレートなどから従来公知の方法で作製すればよい。また、前記基板上に形成する作用極および対極を含む電極は、例えば銀、白金などの金属、もしくは炭素またはこれらの混合物などを用い、例えばスクリーン印刷法などにより設ければよい。また、作用極および対極を形成する二極電極系ではなく、より精度の高い測定をするために参照極を設けて三極電極系を採用してもよい。

【0009】さらに、基板上に形成された電極の表面を、後述する酵素などから保護するために、親水性高分子で被覆するのが好ましい。このような親水性高分子としては、例えばカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、

カルボキシエチルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ゼラチンもしくはその誘導体、無水マレイン酸もしくはその塩の重合体などがあげられる。これらは、センサ応答性に悪影響を与えない範囲で組み合わせて用いてもよい。

【0010】つぎに、本発明のバイオセンサにおける反応層は、少なくとも酵素、電子受容体を用いて、従来公知の方法で形成する。前述のように、赤血球吸着剤をこの反応層に含ませてもよい。また、電極上に設けられる反応層中の酵素および電子受容体と、赤血球吸着剤とを接触しない構造により、電極への赤血球の接近をより有効に阻止することができるという点から、赤血球吸着剤を前記反応層に含ませず、赤血球吸着剤からなる層を、前記反応層と別個に設けてもよい。ここで、赤血球吸着剤としては、赤血球を捕捉するものであればよい。例えば血液中から白血球を分離するために用いられるデキストランなどがあげられる。

【0011】本発明における反応層を構成する酵素は、被検物質の種類に応じて適宜選択すればよいが、例えばグルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ピラノースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アスコルビン酸デヒドロゲナーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、ウリカーゼなどがあげられる。これらの酵素は、被検物質の種類に応じて組み合わせて用いてもよい。

【0012】また、前記反応層を構成する電子受容体としては、例えばフェリシアン化ナトリウム、フェリシアン化カリウム、*p*-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、インドフェノールもしくはその誘導体、 β -ナフトキノーン-4-スルホン酸ナトリウム、 β -ナフトキノーン-4-スルホン酸カリウム、メチレンブルー、またはフェロセンもしくはその誘導体などがあげられる。なかでも、血液中の赤血球に変化を与える可能性が少ないという点から、フェリシアン化ナトリウムを用いるのが好ましい。

【0013】前記親水性高分子、酵素および電子受容体は、溶媒に溶解して本発明のバイオセンサの製造に供するが、この溶媒としては、例えば水、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液またはトリス塩酸緩衝液などの緩衝液などを用いることができる。

【0014】前記反応層中の酵素の含有量は、測定対象となる試料中の基質の量に影響されることなく酵素反応が行われる範囲であればよい。前記反応層中の電子受容体の含有量は、試料中の基質濃度に応じた範囲であればよい。反応層中のその他の成分としては、例えば親水性高分子や緩衝液の成分などを、本発明の効果を損なわない範囲で含んでいてもよい。

【0015】また、前記赤血球吸着剤からなる層を設け

る場合は、赤血球吸着剤を水または溶媒に溶解した溶液を用いて形成する。溶媒としては、前記反応層形成時に用いたものと同じものを用いることができる。

【0016】ここで、図1に示す本発明のバイオセンサの一実施の形態に代表させて、本発明のバイオセンサの構造について説明する。図1は、本発明のバイオセンサの一実施の形態の構造を示す概略縦断面図である。なお、図1においては、カバーおよびスペーサーは省略している。図1に示すように、本発明のバイオセンサを得るためには、まず、ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性基板1上に、スクリーン印刷法などにより銀ペーストなどを印刷してリード2および3を形成する。さらに、基板1上には、同様の印刷法により、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストなどからなる作用極4および対極5を含む電極、ならびに電気絶縁性ペーストなどからなる電気絶縁層6を形成する。電気絶縁層6は、バイオセンサの性能を一定にして使い捨てに適したものであるという点から、作用極4および対極5の露出部分の面積を一定とし、かつリード2および3を部分的に覆うように形成するのが好ましい。このように電極を形成した電気絶縁性基板1上に、親水性高分子層7、酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含む反応層8を形成する。

【0017】つぎに、図2は、図1に示す本発明のバイオセンサの概略分解斜視図を示す。図2に示すように、カバー12の内側となる部分には、試料の供給を容易にするために、レシチン層10を形成するのが好ましい。なお、図1および図2に示す本発明のバイオセンサにおいては、反応層8に酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含めたが、赤血球吸着剤を反応層8に含めず、例えばカバー12の内側となる部分に、赤血球吸着剤からなる層9およびレシチン層10を形成してもよい（図3参照）。

【0018】

【実施例】以下に、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらにのみ限定されるものではない。

《実施例1》ここでは、バイオセンサとして、図1に示す構造を有するグルコースセンサを製造した。まず、絶縁性基板1上に親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース(CMC)の0.5重量%水溶液5 μ lを電極表面に滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて親水性高分子層7を形成した。つぎに、酵素としてグルコースオキシダーゼ(EC1.1.3.4, GOD)200ユニット、電子受容体としてフェリシアン化ナトリウム40 μ mol、および赤血球吸着剤としてデキストラン30mgを、水1mlに溶解して混合水溶液を調製した。この混合水溶液5 μ lを親水性高分子層7の上に滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて、酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含む反応

層8を形成した。また、レシチンの0.5重量%トルエン溶液を調製し、カバー12の内側に滴下乾燥させて、レシチン層10を形成した。上記のようにして基板上に親水性高分子層7、ならびに酵素、電子受容体および赤血球吸着剤を含む反応層8を形成し、レシチン層10をカバー側に形成した後、カバー12およびスパーサー11を図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって絶縁性基板1と接着してグルコースセンサを作製した。

【0019】【評価方法】このグルコースセンサの血液試料として、グルコース濃度が300mg/dl、赤血球容積比（ヘマトクリット値）が0%（血漿）、25%、38%および50%の血液を調製した。ヘマトクリット値が0%の試料液3μlを試料供給孔13より供給すると、血液試料は空気孔14まで達し、反応層8が溶解した。そして、試料を供給してから60秒後に、電極の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。同様にして、ヘマトクリット値が25%、38%、50%の試料液を用いて測定した。測定結果を図4に示す。図4は、ヘマトクリット値（%）と電流値（μA）の関係を示す図である。図4より、得られた電流値は、血液試料中のヘマトクリット値に関わらず、一定であった。

【0020】《実施例2》図3に示す構造を有するグルコースセンサを製造した。これは、図1に示す構造を有するグルコースセンサにおいて、反応層8に赤血球吸着剤を含ませず、別途赤血球吸着剤からなる層を設けたものである。絶縁性基板1上にCMCの0.5重量%水溶液5μlを電極表面に滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて親水性高分子層7を形成した。つぎに、GOD200ユニットとフェリシアン化ナトリウム40μmolを水1mlに溶解した混合水溶液を調製した。この混合水溶液を親水性高分子層7の上に5μl滴下し、50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させて、酵素および電子受容体を含む反応層8を形成した。つぎ

に、デキストランの3%水溶液を調製し、カバー12の内側となる部分に3μl滴下して50℃の温風乾燥機中で10分間乾燥させ、赤血球吸着剤層9を形成した。さらに、レシチンの0.5重量%トルエン溶液を調製し、赤血球吸着剤層9の上に滴下して乾燥させ、レシチン層10を形成した。上記のようにして絶縁性基板1上に親水性高分子層7、ならびに酵素および電子受容体を含む反応層8を形成し、赤血球吸着剤層9およびレシチン層10をカバー12側に形成した後、カバー12およびスパーサー11を、図2中の一点鎖線で示すような位置関係をもって絶縁性基板1と接着してグルコースセンサを作製した。

【0021】得られたグルコースセンサについて、実施例1と同様にして評価を行った。ヘマトクリット値が0%の試料液3μlを試料供給孔13より供給すると、血液試料は空気孔14まで達し、赤血球吸着剤層9と反応層8が溶解した。そして、試料を供給してから60秒後に、電極系の対極5と作用極4の間に+0.5Vの電圧を印加し、5秒後の電流値を測定した。ヘマトクリット値が25%、38%、50%の試料液を用いて測定した結果、得られた電流値は、試料中のヘマトクリット値に関わらず、一定であった。

【0022】《比較例1》電極上に親水性高分子層7ならびに酵素および電子受容体を含む反応層8を形成し、カバー12の内側にレシチン層10のみを形成したほかは、実施例2と同様にして、比較用のグルコースセンサを作製した。得られたグルコースセンサについて、実施例1と同様にしてセンサの応答特性を測定した。その結果を図3に示す。図3より、電流値は、ヘマトクリット値の増加にともなって減少した。この減少割合を表1に示す。なお、ヘマトクリット値が0%のときの電流値を100とした。

【0023】

【表1】

ヘマトクリット値 (%)	割合*1
0	100
25	95
38	89
50	80

*1 ヘマトクリット値0%の試料の電流応答値を100とした場合

の各試料の電流応答値の割合

【0024】《実施例3》本実施例においては、図1に示す構造を採用し、グルコースオキシターゼ200ユニットの代わりにコレステロールオキシターゼ500ユニットを用いたほかは、実施例1と同様にしてコレステロールセンサを作製し、その評価を行った。このコレステ

ロールセンサの血液試料として、コレステロール濃度が300mg/dl、赤血球容積比（ヘマトクリット値）が0%（血漿）、25%、38%および50%の血液を調製し、実施例1と同様にセンサの応答特性を測定したところ、ヘマトクリット値に関わらず、電流値は一定で

あった。

【0025】《実施例4》本実施例においては、図3に示す構造を採用し、グルコースオキシターゼ200ユニットの代わりにコレステロールオキシターゼ500ユニットを用いたほかは、実施例2と同様にしてコレステロールセンサを作製し、実施例3と同様にしてその評価を行った。その結果、ヘマトクリット値に関わらず、電流値は一定であった。

【0026】《実施例5》本実施例においては、図3に示す構造を採用し、グルコースオキシターゼ200ユニットの代わりに乳酸オキシターゼ500ユニットを用いたほかは、実施例2と同様にして乳酸センサを作製し、その評価を行った。血液試料として、乳酸濃度が10mg/dl、赤血球容積比（ヘマトクリット値）が、0%（血漿）、25%、38%、50%の血液を調製した。そして、実施例1と同様にして、センサの応答特性を測定したところ、ヘマトクリット値に関わらず、電流値は一定であった。

【0027】

【発明の効果】以上のように、本発明によれば、血液試料中の被検物質以外の成分、特に赤血球の影響を受けず、高精度の定量が可能なバイオセンサを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のバイオセンサの一実施の形態の構造を示す概略縦断面図である。

【図2】図1に示す本発明のバイオセンサの概略分解斜視図である。

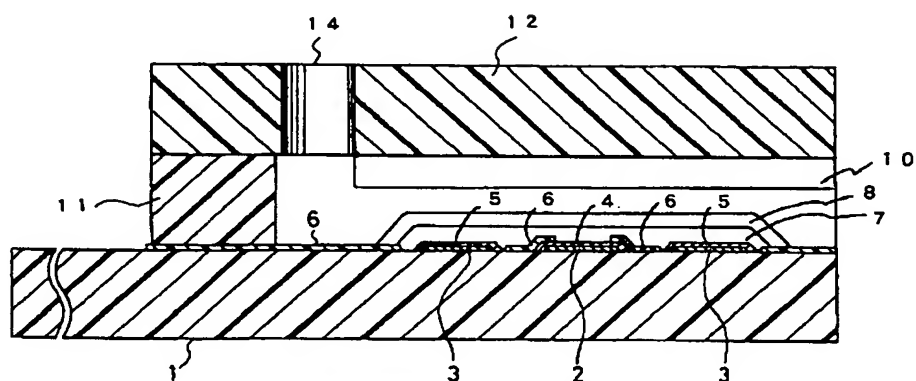
【図3】本発明のバイオセンサの別の実施の形態の構造を示す概略縦断面図である。

【図4】実施例1および比較例1におけるヘマトクリット値（%）と電流値（ μA ）の関係を示す図である。

【符号の説明】

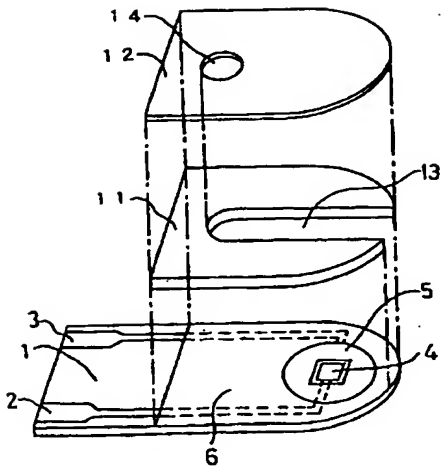
- 1 電気絶縁性基板
- 2 リード
- 3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 電気絶縁層
- 7 親水性高分子層
- 8 反応層
- 9 赤血球吸着剤からなる層
- 10 レシチン層
- 11 スペース
- 12 カバー
- 13 試料供給路の開口部
- 14 空気孔

【図1】

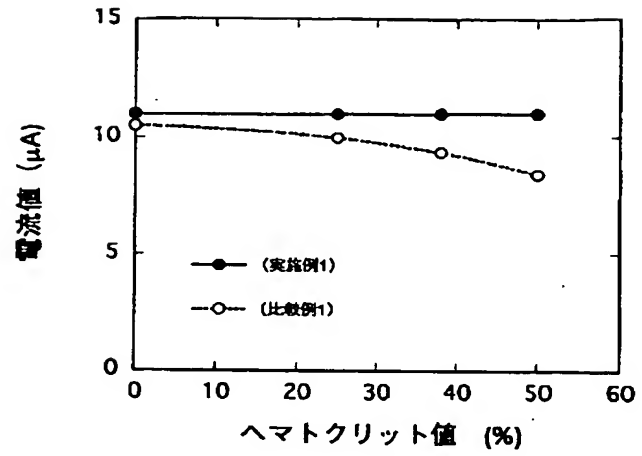


- | | |
|-----------|--------------|
| 1 電気絶縁性基板 | 8 反応層 |
| 2 リード | 10 レシチン層 |
| 3 リード | 11 スペース |
| 4 作用極 | 12 カバー |
| 5 対極 | 13 試料供給路の開口部 |
| 6 電気絶縁層 | 14 空気孔 |
| 7 親水性高分子層 | |

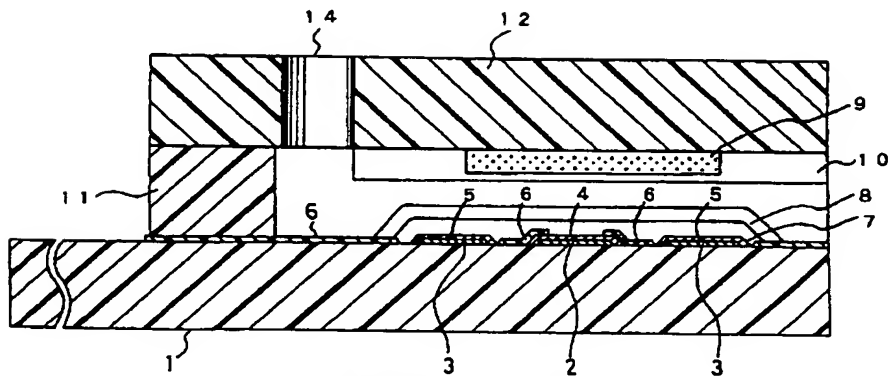
【図2】



【図4】



【図3】



9 赤血球吸着剤からなる層